

# 論文内容要旨

## 脳由来神経栄養因子（BDNF）を用いた 非外科的歯周治療の基礎研究

主指導教員：栗原 英見 教授

（医歯薬保健学研究科 歯周病態学）

副指導教員：兼松 隆 教授

（医歯薬保健学研究科 細胞分子薬理学）

副指導教員：柴 秀樹 教授

（医歯薬保健学研究科 歯髄生物学）

佐々木 慎也

（医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻）

## 【目的】

歯周炎は糖尿病や心疾患、関節リウマチなど多くの全身疾患との関連が報告されていることから、歯周炎の治療は単に口腔内の問題解決でなく、全身の健康増進への貢献度も高いと考えられる。しかし、重症化した歯周炎の治療は困難で、現在の歯周組織再生療法には、外科的侵襲が避けられないことや適応症に限られることなど、克服すべき問題が残っている。そこで、本研究は歯周炎の病態が悪化する前に、軽度破壊された歯周組織を再生させる非外科的歯周治療法を開発することを目的とした。当研究室ではこれまでに、フラップ手術に脳由来神経栄養因子 (BDNF) /高分子ヒアルロン酸 (HMW-HA) 複合体ゲルを併用すると、セメント質と歯槽骨の再生が促進されることをビーグル犬とカニクイザルの根分岐部病変モデル(中等度歯周組織欠損を想定) で明らかにした。さらに非外科的に歯周組織を再生する上での障害となる歯肉上皮細胞のアポトーシスを BDNF が誘導することも *in vitro* で明らかにした。これらの BDNF の特徴を踏まえて、軽度歯周炎に対してスケーリング・ルートプレーニング (SRP) を行い、歯周ポケット内に BDNF を投与することで非外科的に歯周組織再生が促進されるという仮説を立てた。さらに再生を誘導するためには炎症の制御が必要であることから、本研究ではマクロファージの活性化に及ぼす BDNF の影響も検討した。

## 【材料と方法】

### 1. 絹糸結紮歯周炎モデルを用いた BDNF の歯周組織再生効果の検討

ビーグル犬の下顎第 2~4 前臼歯に絹糸を結紮し、軽度歯周組織破壊を伴う歯周炎モデルを作製した。SRP 後に BDNF/HMW-HA 複合体ゲルを歯周ポケット内に注入した (BDNF/HMW-HA 群)。対照として無処置群、SRP のみ行う群、SRP 後に HMW-HA を投与する群を設定した。処置前と処置 2 週間後または 6 週間後に臨床データ (アタッチメントレベル、ポケットデプス、プロービング時の出血、歯肉炎指数) を記録した後に灌流固定し、組織標本作製後、HE 染色、アザン染色、免疫染色 (オステオポンチン、BDNF 受容体 TrkB) を行い観察した。

### 2. マクロファージ活性に及ぼす BDNF の影響の検討

#### (1) 食食能

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた。細胞を BDNF (50 ng/mL) で 12 時間刺激し、培養終了 30 分前に FITC 標識ラテックスビーズを培地中に加えて食食させ、蛍光強度を測定した。BDNF 添加の 30 分前に K252a (TrkB 阻害剤) もしくは Rac1 阻害剤を加えてその影響も評価した。BDNF が GTP 結合型 Rac1 発現および Rac1 のリン酸化に及ぼす影響をブルダウンアッセイとウェスタンブロッティングによって解析した。

#### (2) 炎症性サイトカイン発現

RAW264.7 を培養終了前の 0、3、6、12、24 時間 BDNF (50 ng/mL) で刺激し、interleukin (IL) -1 $\beta$ 、IL-6、tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。また、K252a を BDNF 添加の 30 分前に作用してその影響を調べた。IL-1 $\beta$  が食食能に及ぼす影響を調べるために、IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 単独もしくは IL-1 $\beta$  の中和抗体存在下で食食能を検討した。

## 【結果と考察】

1. BDNF/HMW-HA 群は対照群と比較し、臨床データが最も改善し、組織学的には歯周ポケット内の上皮の根尖側への増殖が抑制され、炎症性細胞浸潤は最も軽度であった。また、コラーゲン線維の埋入を伴う新生セメント質と新生骨が観察された。新生セメント質表層や新生骨に TrkB とオステオポンチンに陽性反応を示す細胞が認められた。以上のことから、BDNF が歯周組織再生を促進したと考えられる。

2. (1) BDNF は RAW264.7 の貪食能を無刺激時と比較し約 2.5 倍上昇させた。その効果は K252a および Rac1 阻害剤によって抑制された。活性型である GTP 結合型 Rac1 およびリン酸化 Rac1 は BDNF 刺激 15 分をピークに発現が促進された。以上のことから、BDNF は Rac1 活性化を介して、マクロファージの貪食を亢進することが示唆された。

(2) BDNF は IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を促進し、その効果は K252a で抑制された。また、IL-1 $\beta$  は RAW264.7 の貪食能を無刺激時と比較し約 3 倍上昇させた。BDNF による炎症性サイトカイン発現促進と貪食亢進の関連については今後さらなる検討が必要である。

## 【結論】

軽度歯周炎に対し BDNF/HMW-HA 複合体ゲルを SRP と併用することによって、過度の炎症が抑制され、歯周組織再生が促進される可能性が示唆された。